

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-253854

(43) 公開日 平成6年(1994)9月13日

(51) Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 1 2 N 15/51	Z N A	7236-4B		
		9359-1E		
		7432-4E		
C 1 2 P 19/38		9050-1E	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数9 F D (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-63515

(71) 出願人 000006770

ヤマサ醤油株式会社

千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1

(22) 出願日 平成5年(1993)2月26日

(72) 発明者 野口 利忠

千葉県銚子市西小川町4399番地6号

(72) 発明者 奥山 潔

千葉県佐倉市鏡木町2丁目6番地13号

(72) 発明者 浜本 智樹

千葉県銚子市新生町2丁目2番地1号

(72) 発明者 緑川 祐一郎

千葉県銚子市海鹿島町5201番地7号

(54) 【発明の名称】 組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの製造法

(57) 【要約】

【目的】 ヌクレオシド・ホスホリラーゼを用いた効率的なヌクレオシドアナログ合成を可能とするため、組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの大量製造を目的とする。

【構成】 ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA分子、それを用いた組換えDNA手法によるヌクレオシド・ホスホリラーゼの製造、および該方法で得られた培養物、微生物菌体、またはその処理物を酵素源として使用するヌクレオシドの製造法に関する。

【特許請求の範囲】

* 1. 以下の式(1)のポリペプチド構造遺伝子を含むDNA分子

【請求項1】 α -ヘリックス属する好熱菌に由来するポリペプチド

品式(1)のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド* 【式(1)】

```

10 30
MetAsnAngThrAlaIleGluGlnAlaAlaAlaPheLeuLysGlyLysPheProThrSer
20 40
ProGlnIleGlyLueIleLeuGlySerGlyLeuGlyValLeuAlaAspGluIleGluGln
30 60
AlaIleLysIleProTyrSerAspIleProAspPheProValSerThrValGluGlyHis
40 80
AlaGlyGlnLeuValTyrGlyGluLeuGlyIleThrValValValMetGlnGlyAng
50 100
PheHisTyrTyrGluGlyTyrSerPheAspLysValThrPheProValAngValMetLys
60 120
AlaLeuGlyValGluIleLeuIleValThrAsnAlaAlaGlyGlyValAsnGluSerPhe
70 140
GluProGlyAspLeuMetIleIleSerAspHisGluAsnAsnMetGlyGlyAsnProLeu
80 160
IleGlyProAspAspSerAlaLeuGlyValAngPheProAspMetSerGluAlaTyrSer
90 180
LysAngLeuAngGlnLeuAlaLysAspValAlaAsnAspIleGlyLeuAngValAngGlu
100 200
GlyValTyrValAlaAsnThrGlyProAlaTyrGluThrProAlaGluIleAngMetIle
110 220
AngValMetGlyGlyAspAlaValGlyYetSerThrValProGluValIleValAlaAng
120 240
HisAlaGlyMetGluValLeuGlyIleSerCysIleSerAsnMetAlaAlaGlyIleLeu
130 260
AspGlnProLeuThrHisAspGluValIleGluThrThrGluLysValLysAlaAspPhe
140 280
LeuAngPheValLysAlaIleValAngAspMetAlaLysAsn

```

(I)

【請求項2】 α -ヘリックス・ β -バレル・ α - β 構造遺伝子の上流にS1配列を含む、請求項1記載のDNA分子

【請求項3】 α -ヘリックス属する好熱菌に由来するポリペプチド

40 配列(1)のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド・ α -ヘリックス・ β -バレル・ α - β 構造遺伝子を含むDNA分子

【式(2)】

(3)

特開平6-253854

3	10	20
MetArgMetValAspLeuIleGluLysLysArgAspGlyHisAlaLeuThrLysGluGlu		
30	40	
IleGlnPheIleIleGluGlyTyrThrLysGlyAspIleProAspTyrGlnMetSerAla		
50	60	
LeuAlaMetAlaIlePhePheArgGlyMetAsnGluGluGluThrAlaGluLeuThrMet		
70	80	
AlaMetValHisSerGlyAspThrIleAspLeuSerArgIleGluGlyIleLysValAsp		
90	100	
LysHisSerThrGlyGlyValGlyAspThrThrThrLeuValLeuGlyProLeuValAla		
110	120	
SerValGlyValProValAlaLysMetSerGlyArgGlyLeuGlyHisThrGlyGlyThr		
130	140	
IleAspLysLeuGluSerValProGlyPheHisValGluIleThrAsnAspGluPheIle		
150	160	
AspLeuValAsnLysAsnLysIleAlaValValGlyGlnSerGlyAsnLeuThrProAla		
170	180	
AspLysLysLeuTyrAlaLeuArgAspValThrAlaThrValAsnSerIleProLeuIle		
190	200	
AlaSerSerIleMetSerLysLysIleAlaAlaGlyAlaAspAlaIleValLeuAspVal		
210	220	
LysThrGlyValGlyAlaPheMetLysAspLeuAsnAspAlaLysAlaLeuAlaLysAla		
230	240	
MetValAspIleGlyAsnArgValGlyArgLysThrMetAlaIleIleSerAspMetSer		

(I I) その 1

【式3】

157 160
 LeuProLeuGlyTyrAlaValGlyAspAlaLeuGlyValGlyAlaLeuAspTyrLeu
 170 180
 LysGlyGlyGlyTyrProGluAspProLeuGlyLeuLysLeuValLeuGlySerHisMetVal
 190 200
 TyrLeuAlaGlyLysAlaGluSerLeuLeuGlyValAlaArgLysPheLeuGlyLysAlaMet
 210 220
 LysAspGlySerAlaLeuGlyThrPheLysThrPheLeuAlaAlaGlyGlyGlyAspAla
 230 240
 SerValValAspAspProSerLysLeuPheGlnAlaGlyTyrIleIleGluLeuGlyAla
 250 260
 LysGluAspGlyTyrValIleSerGluLeuValAlaAspAlaValGlyThrAlaAlaMetTrp
 270 280
 LeuGlyAlaGlyArgAlaThrLysGluSerThrIleAspLeuAlaValGlyLeuValLeu
 290 300
 ArgLysLysValGlyAspAlaValLysLysGlyGluSerLeuValThrIleTyrSerAsn
 310 320
 ArgGluGlnValAspAspValLysGluLysLeuTyrIleAsnIleArgIleSerAlaThr
 330 340
 ProValGlnAlaProThrLeuIleTyrAspLysIleSer

(I-1) その2

【請求項4】 ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の主流にSD配列を含有する、請求項3記載のDNA分子。

【請求項5】 細胞内で複製可能なベクターの発現制御シグナルの下流に請求項1および/または3記載のDNA分子を組み込んでなる、組換えベクター。

【請求項6】 発現制御シグナルが大腸菌内で作用するプロモーターを少なくとも含むものである、請求項5記載の組換えベクター。

【請求項7】 請求項5記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養して当該酵素を生産させた、好熱菌由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼを保持する微生物菌体を含有する培養物。

【請求項8】 請求項7記載の培養物から分離した好熱菌由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼを保持する微生物菌体、またはその処理物。

【請求項9】 塩基供与体、糖残基供与体及び/又は酸供与体をヌクレオシド・ホスホリラーゼを含有する酵素調製物を用いて反応させ、塩基供与体の塩基部分と糖残基供与体の糖部分との間にリンゲージ結合を形成させてヌクレオシドを製造する方法において、ヌクレオシド・ホスホリラーゼを含有する酵素調製物として請求項7または8記載のものを使用することを特徴とする、ヌクレオシドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、バナラス属に属する好熱菌由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼの組換えDNA手法による製造法および該方法で得られた酵素のヌクレオシド製造への応用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】核酸系化学療法剤は、抗腫瘍、免疫抑制、抗ウイルスなどの種々に用途に使用されている。また、近年のエイズの流行とともにヌクレオシドアナログの抗ウイルス作用が注目され、種々のヌクレオシドアナログが合成され、その抗ウイルス活性が試験されている（化学と生物、第27巻、第6号、第356～368頁）。従来、これらのヌクレオシドアナログの多くは化学的に合成されてきたが、微生物由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼを利用することにより数々のヌクレオシドアナログを効率的に調製できる事が明らかになるにつれて、該酵素の利用はヌクレオシドアナログ合成の重要な手段となっている（発酵と工業、第27巻、第11号、第927～937頁）。

【0003】一般に、酵素の調製法としては操縦性あるいは経済性、或は微生物が有利である。ヌクレオシド・ホスホリラーゼは、動物、微生物など種々の生物に存在することが確認されており、そのいくつかは単離精製

されて酵素学的諸性質が報告されている。たとえば、バシラス属に属する好熱菌の一種であるバシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) に関してもヌクレオシド・ホスホリラーゼの存在が確認されている。すなわち、プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ (E.C. 2. 4. 2. 1.)、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ (E.C. 2. 4. 2. 2.) と同該微生物より単離精製され、その諸性質も報告され (J. Biol. Chem., 244, 3691 (1969), Agric. Biol. Chem., 53, 2205 (1989), Agric. Biol. Chem., 53, 3219 (1989))、それらの酵素を利用したヌクレオシドアナログの合成も報告されている (Agric. Biol. Chem., 53, 197-202 (1989), 特開昭56-166199号公報、特開昭56-164793号公報、特開平1-320995号公報)。

【0004】山内らは、バシラス属に属する好熱菌から耐熱性があり比活性が高いヌクレオシド・ホスホリラーゼ (プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ) を有するバシラス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 7H6-2株を見だし、該菌株からヌクレオシド・ホスホリラーゼを単離することに成功した (国際特許公開WO90/110080号、日本農芸化学会誌、第63巻、第3号 (1989年度大会講演要旨集)、第283頁)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】山内らの見いだした上記の酵素は極めて優れた酵素ではあるが、ヌクレオシド製造の酵素源として上記微生物の菌体自体を使用する場合、孢子形成に伴う自己溶菌により反応液中に酵素が離脱し、ヌクレオシドの連続的な合成に悪影響を及ぼしたり、溶菌に伴う菌体蛋白質の流出がヌクレオシドの合成および精製に支障をきたすという欠点を有していた。また、微生物の菌体を酵素源として使用する場合の一般的な問題として、菌体内に含まれる種々の酵素により基質

もし、は生成物の分解などの副反応が生じ、生成物の収率の低下を招くという問題があることを常に認識しておかなければならない。

【0006】このような微生物菌体を酵素源として使用する手法の問題点を解決するため、精製酵素標品を酵素源として用いる方法も考えられてはいるが、バシラス・ステアロサーモフィラスは、蛋白質分解活性を有し、ヌクレオシド・ホスホリラーゼの生産量も少なく、かつ該酵素の精製操作も煩雑であることから、該菌株からヌクレオシド・ホスホリラーゼを収率よく回収することは事実上困難なことであった。

【0007】上記の問題を克服するための第一歩として、山内はバシラス・ステアロサーモフィラス由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含有するDNA断片を大腸菌にクローニングし、当該酵素が大腸菌において生産できることを見いだした (特開平4-4882号公報)。しかしながら、該方法で造成された組換え大腸菌におけるヌクレオシドホスホリラーゼの生産量は好熱菌におけるその生産量と同等以下であり、これをヌクレオシド製造の酵素源として使用したとしても、到底実用化に耐えうるものではなかった。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意検討した結果、バシラス・ステアロサーモフィラス由来のヌクレオシドホスホリラーゼをコードするDNAの一次構造を解析し、この解析結果をもとに組換えDNA手法により大腸菌において該酵素を大量生産させることに成功し、本発明を完成させた。

【0009】すなわち、本発明は、バシラス属に属する好熱菌に由来し、下記式(1)のアミノ酸配列をコードするプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子に関するものである。

【0010】

【式4】

	位置	時間+6	5 3 8 5 4
MetAsnArgThrAlaLeuGluAlaAlaThrProLeuLysGlyGlyPheProThrSer	10	20	
ProGlnIleGlyLeuIleLeuGlySerGlyLeuGluValLeuAlaAspGluIleGluGln	30	40	
AlaValLysIleProTyrSerAspIlePheAsnPheProValSerThrValGluGlyHis	50	60	
AlaGlyGlnLeuValTyrGlyGlnLeuGluAlaThrValValValMetGlnGlyArg	70	80	
PheHisTyrTyrGluGlyTyrSerPheAsnLysValThrPheProValArgValMetLys	90	100	
AlaGluGlyValGluGlnLeuIleValThrAsnAlaValGlyGlyValAsnGluSerPhe	110	120	
GluProGlyAspGluMetIleGluSerAspHisIleAsnAsnMetGlyGlyAsnProLeu	130	140	
IleGlyProAsnAspSerAlaLeuGlyValArgPhePheAspMetSerGluAlaTyrSer	150	160	
LysArgLeuArgGlnLeuAlaLysAspValAlaAsnAspIleGlyLeuArgValArgGlu	170	180	
GlyValTyrValAlaAsnThrGlyProAlaTyrGluThrProAlaGluIleArgMetIle	190	200	
ArgValMetGlyGlyAspAlaValGlyMetSerThrValProGluValIleValAlaArg	210	220	
HisAlaGlyMetGluValLeuGlyIleSerGlyIleSerAsnMetAlaAlaGlyIleLeu	230	240	
AspGlnProLeuThrHisAspGluValIleGluThrThrGluLysValLysAlaAspPhe	250	260	
LeuArgPheValLysAlaIleValArgAsnMetAlaLysAsn	270		

(I)

【0011】また、本発明は、バネラス属に属する好熱菌に由来し、下記式(1)のアミノ酸配列をコードするピリミジンヌクレオチド・ホスホゲノール糖構造遺伝子

を含有するDNA分子に関するものである。

【0012】

【式5】

(7)

特開平6-253854

11	10	12
	10	20
MetArgMetValAspLeuIleGluLysLysArgAspGlyHisAlaLeuThrLysGluGlu		
	30	40
IleGlnPheIleIleGluGlyTyrThrLysGlyAspIleProAspTyrGlnMetSerAla		
	50	60
LeuAlaMetAlaIlePhePheArgGlyMetAsnGluGluGluThrAlaGluLeuThrMet		
	70	80
AlaMetValHisSerGlyAspThrIleAspLeuSerArgIleGluGlyIleLysValAsp		
	90	100
LysHisSerThrGlyGlyValGlyAspThrThrThrLeuValLeuGlyProLeuValAla		
	110	120
SerValGlyValProValAlaLysMetSerGlyArgGlyLeuGlyHisThrGlyGlyThr		
	130	140
IleAspLysLeuGluSerValProGlyPheHisValGluIleThrAsnAspGluPheIle		
	150	160
AspLeuValAsnLysAsnLysIleAlaValValGlyGlnSerGlyAsnLeuThrProAla		
	170	180
AspLysLysLeuTyrAlaLeuArgAspValThrAlaThrValAsnSerIleProLeuIle		
	190	200
AlaSerSerIleMetSerLysLysIleAlaAlaGlyAlaAspAlaIleValLeuAspVal		
	210	220
LysThrGlyValGlyAlaPheMetLysAspLeuAsnAspAlaLysAlaLeuAlaLysAla		
	230	240
MetValAspIleGlyAsnArgValGlyArgLysThrMetAlaIleIleSerAspMetSer		

(I I) その 1

【式6】

180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000

(I I) その2

【0013】さらに、本発明は、細胞内で複製可能なベ
 クターの発現制御シグナルの下流に上記ヌクレオチド・
 ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分子を組み
 込んでなる組換えベクター、該組換えベクターで形質転
 換された形質転換体を培養して当該酵素を生産させた
 好熱菌由来のヌクレオチド・ホスホリラーゼを保持する
 微生物菌体を含有する培養物、および該培養物から分離
 した好熱菌由来のヌクレオチド・ホスホリラーゼを保持
 する微生物菌体もしくはその延伸物に関するものであ
 る。

【0014】さらにまた、本発明は、塩基供与体、糖残
 基供与体及びリン酸供与体をヌクレオチド・ホスホリ
 ラーゼを含有する酵素調製物を用いて反応させ、塩基供
 与体の塩基部分と糖残基供与体の糖部分との間にヌー
 クレオチド結合を形成させてヌクレオチドを製造する方
 法において、ヌクレオチド・ホスホリラーゼを含有する酵
 素調製物として上記培養物または上記微生物菌体もしく
 はその延伸物を使用することと特徴とするヌクレオチド
 製造法に関するものである。

【0015】以下、本発明について詳述する。なお、本
 明細書における以下の用語は下記の定義で用いられて
 いる。「パシラス属に属する好熱菌由来」とは、DNA分
 子の塩基配列がパシラス属に属する好熱菌の遺伝子のそ
 れと実質的に同じであるということの意味するものであ

り、必ずしも本発明によるDNA断片がパシラス属に
 属する好熱菌から抽出されたものに限定されることを意
 味するものではない。「塩基配列が実質的に同じ」と
 は、ヌクレオチド・ホスホリラーゼとしての遺伝情報が
 維持されている限り、いくつかの単位ヌクレオチド（塩
 基）の置換、欠失及び/または付加があってもよいこと
 を意味する。

【0016】1.ヌクレオチド・ホスホリラーゼ構造遺
 伝子を含有するDNA分子

本発明におけるパシラス属に属する好熱菌由来のヌクレ
 オチド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA分
 子とは、上記式(1)および/または式(1.1)のアミ
 ノ酸配列をコードするヌクレオチド・ホスホリラーゼ構
 造遺伝子を含有するものであり、その具体的な塩基配列
 は特に限定されるものではない。たとえば、図1に示す
 制限酵素地図は規定されるDNA分子、より具体的に、
 プリミナシラス属に属する好熱菌由来のDNA分子を含有
 するDNA分子としてはN1で切断されるものを、ゼラ
 ミナシラス属に属する好熱菌由来のDNA分子としてはR1
 で切断されるものを、プリミナシラス属に属する好熱菌
 由来のDNA分子としてはR2で切断されるものを、ゼラ
 ミナシラス属に属する好熱菌由来のDNA分子としてはR3
 で切断されるものを、それぞれ例示

ることができる。

【0017】このようなDNA分子は、ヌクレオシド・ホスホリラーゼの構造遺伝子の他に少なくとも構造遺伝子の5'上流にSD配列を含有するものであり、構造遺伝子のみを含有するDNA分子を使用した時と比較してヌクレオシド・ホスホリラーゼの生産量を著しく増加させることができる点で、本発明の目的にかなうものである。従って、本発明方法においては、図2〜4に示す塩基配列中の少なくともSD配列から終止コードまでの塩基配列を含有するDNA分子を使用することが好ましい。なお、(プ)ヌクレオシド・ホスホリラーゼおよびピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼの両酵素を生産させる場合には、そのDNA分子中の構造遺伝子の5'上流にSD配列が少なくとも一つ存在するものを使用すればよい。

【0018】なお、図1における「punA」は(プ)ヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子(832 bp、271個のアミノ酸からなる分子量91,628のポリペプチドをコードする)、「pyo」はピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子(1298 bp、433個のアミノ酸からなる分子量46,271のポリペプチドをコードする)を示す。本発明者による解析では、両遺伝子はクラスターをなしており、それぞれその翻訳開始に必要なリボソーム結合部位を有しているが、その近傍の5'上流に好熱菌のプロモーター構造及び大腸菌で機能できるようなプロモーター構造を有していない。

【0019】このようなDNA分子は、先の山内の方法(特開平4-4882号公報)などのように高温でのヌクレオシド分解活性を指標としてバクテラス属に属する好熱菌からクローン化することができる。あるいは通常よく行われるように、バクテラス属に属する好熱菌由来の精製したヌクレオシド・ホスホリラーゼのアミノ末端などの一部アミノ酸配列を既知の方法で決定し、もしくは上記式(1)および/または式(1')のアミノ酸配列の一部の配列を参考にし、それに相当するオリゴヌクレオチドを合成し、該オリゴヌクレオチドをプローブとしてバクテラス属に属する好熱菌の遺伝子バンクよりヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片をスクリーニングする方法も採用できる。クローン化に用いる宿主は特に限定されないが、操作性及び簡便性から大腸菌を宿主とするのが適当である。さらに、図2〜4を参照して通常のDNA合成機を用いて化学的に合成してもかまわない。

【0020】通常、プラスミドベクターなどにはこれらの断片をクローン化しても、該DNA断片はプロモーターを有していないか、あるいはプロモーターを有していても異種微生物内で効率的に機能できないことが多い。コードされた遺伝子の高発現は通常起こらないとされている。また、コーディング領域以外の全分DNAを有していると、たとえプラスミドベクター上に存在している

他の遺伝子のプロモーターからのリードスルー(read through)転写によっても、その発現が起こることがあり、好ましいことではない。このため、目的とする遺伝子の高発現を具現化するためには、クローン化したDNA断片の塩基配列を解析し、該遺伝子のコーディング領域を特定し、宿主微生物に応じて該遺伝子が微生物菌体中で高発現可能となるように発現制御シグナル(転写開始及び翻訳開始シグナル)をその5'上流に連結した組換え発現ベクターを作製する必要がある。DNA塩基配列の決定は、常法により行うことができ、たとえばマキサム・ギルハートの方法(Methods in Enzymology, 65, 499(1980))もしくはダイデオキシシチンキナーゼミネーター法(Methods in Enzymology, 10, 20(1983))などを応用して行うことができる。

【0021】2. 組換えベクター

ヌクレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子を異種微生物内で大量発現させるために使用する発現制御シグナルとしては、人為的制御が可能で、ヌクレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現量を飛躍的に上昇させるような強力な転写開始並びに翻訳開始シグナルを用いることが望ましい。このような転写開始シグナルとしては、宿主として大腸菌を用いる場合には、lacプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 21(1983), Gene, 20, 231(1982)), trcプロモーター(J. Biol. Chem., 260, 3-39(1985))などを、酵母を宿主とする場合にはグリセラルデヒド-3-オスフェート・デヒドロゲナーゼ(J. Biol. Chem., 254, 2078(1980))や抑制性酸性ホスファターゼ(Nucl. Acids Res., 11, 1657(1983))などの遺伝子の発現制御シグナルを例示することができる。

【0022】ベクターとしては、種々のプラスミドベクター、ファージベクターなどが使用可能であるが、微生物菌体内で複製可能であり、適当な薬剤耐性マーカーと特定の制限酵素切断部位を有し、菌体内のコピー数の高いプラスミドベクターを使用するのが望ましい。具体的に大腸菌を宿主とする場合には、pBR322(Gene, 2, 95(1975)), pUC18, pUC19(Gene, 33, 103(1985))などを例示することができる。また、酵母を宿主とする場合には、YEp13(ATCC 37115), YEp24(ATCC37651)などを例示することができる。ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の調製、クローニングした遺伝子と発現制御シグナルとの連結などの方法は、一般の技術者、特に分子生物学、遺伝子工学の分野に属する技術者にとっては周知の技術であり、具体的には、例えば「Molecular Cloning」(Maniatisら編, Cold Spring Harbor, New York(1982))に記載の方法に従って行うことができる。

【0023】3. 形質転換体の作製と培養

作製した組換えベクターを用いて微生物を形質転換する。宿主となる微生物としては安全性が高く取扱いやす

いものであるが、原料は限定されない。例えば、大腸菌、酵母などの微生物を宿主に使用することができ、宿主として使用することができる。その中でも、大腸菌が取扱い上、及びスケレオシドアナログの合成上有利であり、例えば細胞抽出液実験に使用される K12株、C600株、JM105株、JM109株などが使用可能である。微生物を形質転換する方法はすでに多くの方法が報告されており、宿主として使用する微生物に依りて適宜選択されたい。例えば大腸菌を宿主として使用する場合は、低塩下、塩化ナトリウム処理して菌体内にプラスミドを導入する方法（J. Mol. Biol. 133, 135-147 (1979)）により大腸菌を形質転換することができる。また、酵母を宿主とする場合には、プロトプラスト法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1908-1913 (1980)）あるいはアルカリ金属処理法（J. Bacteriol. 153, 163 (1983)）などの方法を採用することができる。

【0024】得られた形質転換体は、当該微生物が増殖可能な培地中で増殖させ、さらにクロマト化したスケレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現を誘導して菌体内に該酵素が大量に蓄積するまで培養を行う。形質転換体の培養は、炭素源、窒素源などの当該微生物の増殖に必要な栄養源を含有する培地を用いて常法に従って行えばよい。例えば、大腸菌を宿主として使用する場合は、培地として 2 x YT 培地（Methods in Enzymology, 100 (1983)）、LB 培地、M9 培地（Molecular Cloning, 前述）などの大腸菌の培養に常用されている培地を用い、20〜40℃の培養温度で必要により通気、攪拌しながら培養することができる。また、ベクターとしてプラスミドを用いた場合には、培養中におけるプラスミドの脱落を防ぐために適当な抗生物質（プラスミドの薬剤耐性マーカー）に応じ、アンピシリン・テトラサイクリンなどの薬剤を適量培養液に加えて培養する。

【0025】培養中にスケレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現を誘導する必要がある場合には、用いたベクターで常用されている方法で該遺伝子の発現を誘導する。例えば、lac プロモーターや tac プロモーターを使用した場合には、培養中期に発現誘導剤であるイソプロピル β-D-チオガラクトピラニド（以下、IPTG と略称する）を適量添加する。また、使用するプロモーターが構成的に転写活性を有する場合には、特に発現誘導剤を添加する必要はない。スケレオシド・ホスホリラーゼ遺伝子の発現を誘導した後、該遺伝子産物を菌体内に大量蓄積させるため、さらに数時間の培養を継続して酵素源としての培養物を得る。得られた培養物は、スケレオシドアナログ合成の酵素源として使用できる。

【0026】4. 培養菌体及びその処理物
組換え菌は、培養後膜分離あるいは遠心分離処理などによりその菌体を回収する。培養菌体そのものを酵素源として使用する場合は、回収菌体を適当な緩衝液に懸濁して直接スケレオシドアナログの合成に使用できる。また、

酵素剤、スクレオシド・アナログ合成を担う酵素には、回収菌体より生産されたスクレオシド・ホスホリラーゼを精製すればよい。例えば、回収した菌体を適当な緩衝液に懸濁し、超音波処理、フレンチプレス処理などにより物理的に菌体を破砕する。あるいは、フレンチ処理など酵素的に溶菌させ、菌体破片を遠心分離により除去して無細胞抽出液を調製する。無細胞抽出液内に該酵素は溶解に存在しているため、無細胞抽出液そのものを酵素原料として使用することができる。さらに精製が必要とされる場合でも、熱処理、硫酸塩析処理、透析処理、エタノールなどの溶媒処理、各種カラムクロマトグラフィー処理などの酵素精製に通常使用されている処理を単独で、またはそれら2種類の処理を組み合わせたことで簡便な手段でスケレオシドアナログ合成に好適な高濃度精製された酵素原料を調製できる。なお、大腸菌を宿主微生物とする場合は、無細胞抽出液を熱処理（60〜80℃で1〜10分）するとほとんど大腸菌由来蛋白質が変性し、遠心分離操作により簡単に除去でき、非常に効率的な酵素の精製が可能である。

【0027】5. スクレオシド・アナログの合成
本発明のスケレオシド・アナログの合成は、上記の培養物または上記の培養菌体もしくはその処理物を使用することを特徴とするものであり、その他の条件方法は公知の方法（たとえば、国際特許公開 WO 90/10080 号参照）に準じて行えばよい。すなわち、使用する酵素の最適条件を予備試験により設定し、この条件下で原料化合物と培養物または培養菌体もしくはその処理物とを反応させることにより実施することができる。さらに具体的には、反応温度としては 30〜95℃、反応時間としては 3〜10 日から適宜至適条件を選択し、適量の無機リン酸を含有する適当な緩衝液に糖基基体としてスクレオシド及び塩基基体として塩基アナログなどを添加し、設定条件下で反応させることにより行うことができる。反応終了後、合成されたスケレオシドアナログは核酸関連物質の精製法として通常使用されている方法を適宜組み合わせることで精製精製することができる。

【0028】

【発明の効果】本発明により前記した従来の問題点が解決され、バシラス属に属する好熱菌由来のスケレオシド・ホスホリラーゼを用いた効率的なスケレオシドアナログ合成が可能となった。すなわち、本発明は下記の利点を与える。

（1）微生物菌体を酵素源とした、副反応の少ない効率的なスケレオシドアナログ合成が可能となる。（バシラス属に属する好熱菌菌体を酵素源としてスケレオシドアナログを合成する場合、スケレオシド・ホスホリラーゼ以外の基質あるいは加成分解酵素も耐熱性を有するため、高温での反応でも副反応が進行する。しかしながら例えば、宿主微生物として大腸菌を用いて高温で合成反応を行えば、大腸菌由来の酵素はそのほとんどが失活

し、副反応はほとんど生じない。また、大腸菌などを宿主微生物とすれば、従来の自己溶菌の問題は解決される。さらに、組換え菌においては好熱菌由来ヌクレオシド・ホスホリラーゼが大量生産されているため、合成反応に使用する菌体量は少量で充分であり、経済的にも効率的なヌクレオシドアナログ合成が可能となる。

【0029】(10) 酵素大量調製が簡便となり、酵素的ヌクレオシドアナログ合成の実用化が可能となる。従来のバクテリウス属に属する好熱菌からのヌクレオシド・ホスホリラーゼの調製は極めて困難であったが、組換えDNA手法により該酵素を大量生産させることで、その大量調製は極めて簡便となる。例えば、大腸菌を宿主微生物とすれば、リゾチーム処理あるいは超音波処理などの簡便な操作で高収率で該酵素を抽出できる。また該酵素は耐熱性を有することから、熱処理を施すことで、副反応に関与する大腸菌酵素を失活除去させることが可能であり、簡便な操作で比活性の高い酵素標品を調製することも可能である。プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ及びピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ両酵素を用いてヌクレオシドアナログを合成する場合、どちらかの酵素が関与する反応が律速となり、効率的な反応が生じない現象がある。しかし、好熱菌からは一定の比率でしかプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼとピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼが調製されず、その比率を変えることは極めて困難であった。しかしながら、両酵素を組換えDNA手法で別々に生産することにより、その比率を改変して効率的なヌクレオシドアナログ合成を行うことも可能となる。このように、本発明はヌクレオシドアナログの効率的な製造を実用化するものであり、産業上きわめて有益なものである。

【0030】

【実施例】以下、*Bacillus stearothermophilus* TH6-2株（微生物研寄第2758号）由来のヌクレオシド・ホスホリラーゼに関して実施例をあげ、具体的に説明する。また、本実施例におけるDNAの調製、制限酵素による切断、T4 DNAリガーゼによるDNA連結、並びに大腸菌の形質転換法は全て「Molecular Cloning」(前述)に従って行った。また、各種制限酵素、T4 DNAリガーゼ、プラスミドベクター pUC118及びpUC119、pPstI リンカー並びにキロシュークエンス用デレーションキットは全て宝酒造(株)より入手した。

【0031】実施例1 好熱菌ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有するDNA断片のDNA塩基配列の決定

先に山内らにより調製された好熱菌*Bacillus stearothermophilus* TH6-2株由来のプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼとピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼをコードする遺伝子を含有する4.6 kbのDNA断片(図1参照、特開平4-14882、この断片が挿入されたpUC119プラスミドを保持する大腸菌K12株エシェリシア・コ

リKY-2は平成2年1月11日に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託され、微生物寄第11197号の受託番号を受けている)よりプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有すると思われる、2.4 kbのSacI-EcoRV DNA断片をpUC118及びpUC119にサブクローニングした。該組換えプラスミドをキロシュークエンス用デレーションキットを用いて、文献(Gene, 28, 351 (1984))の方法に従って当該挿入部分の一部が脱落し、異なる鎖長を持った種々のコロニーを作製した。得られた種々のコロニーの挿入断片について、ダイデオキシジエシタールミナーター法(Science, 214, 1295 (1981))によりDNA塩基配列を決定した。その結果、図2に示すプリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子のDNA配列を得た。この塩基配列は、822 bpであり、Metで始まる271個のアミノ酸からなる分子量29,637のポリペプチドをコードする。なお、このペプチドのアミノ末端20個のアミノ酸配列は、精製単離した好熱菌プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼのそれと完全に一致した。

【0032】次に、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含有すると思われる2.8 kbのPstI-EcoRI DNA断片に関しては、pUC118及びpUC119に各種制限酵素を用いてショットガンサブクローニングを行い、先と同様ダイデオキシジエシタールミナーター法でその塩基配列を決定した。その結果、図3および4に示すピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を得た。この塩基配列は、1,298 bpであり、433個のアミノ酸からなる分子量46,271のポリペプチドをコードする。なお、このペプチドのアミノ末端10個のアミノ酸配列は、精製単離した好熱菌ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼのそれと完全に一致した。

【0033】実施例2 好熱菌ヌクレオシド・ホスホリラーゼ高発現用組換えベクターの作製

プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ生産用組換えベクター-pTrec-punaを以下の方法で作製した(図5参照)。すなわち、プラスミドベクター-pTrec99A(Gene, 69, 301 (1988)、Pharmacia社より入手)を制限酵素NcoI及びSmaIで切断後、プリンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子及びSD配列を含有するNcoI-BglII DNA断片を上記プラスミドベクター-pTrec99Aの切断断片とをT4 DNAリガーゼを用いて連結し、該連結反応液を用いて大腸菌JM105株を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換体より、pTrec99Aの発現用trecプロモーターの直後にSD配列及びプリンヌクレオシドホスホリラーゼ構造遺伝子が挿入された組換えベクター-pTrec-punaを得た。

【0034】次に、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ高発現用組換えベクター-pTrec-pvnを作製した(図6参照)。すなわち、先の4.6 kbのDNA断片を制限酵素EincIIで部分分解し、さらにその生成物にT4 DNA

【0.03.6】また、pTrec99Aを、5'末端に制限酵素PstIの切断部位（3'末端にSalIの切断部位）を有する、1.2 kbのPstI-DNA断片を調製した。このDNA断片を制限酵素PstIで切断したpTrec99Aを、1 kbのDNAライゲーション反応液を用いて連結反応を行い、さらに該反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換体より、pTrec99Aのtrecプロモーター直後のPstI切断部位に、スクレオシド・ホスホリラーゼ及びヒリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子が挿入された組換えベクターpTrec-NBを得た。

【0.03.7】または、好熱菌*Bacillus pasteurii*株・*Bacillus pasteurii*株及びヒリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ肉酵素生産用ベクターpTrec-NBを作製した（図7参照）。すなわち、先づ4.6 kbのDNA断片より肉酵素構造遺伝子及びそれぞれのSD配列を含有するNeoI-EcoRI-DNA断片を制限酵素NeoI及びEcoRIで切断したpTrec99Aを、1 kbのDNAライゲーション反応液を用いて連結反応を行い、その連結反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換体より、pTrec99Aのtrecプロモーター直後のNeoI-EcoRI切断部位に、スクレオシド・ホスホリラーゼ及びヒリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼのSD配列及び構造遺伝子が挿入された組換えベクターpTrec-NBを得た。

【0.03.8】実施例3：形質転換体の培養、酵素抽出
上記3種類の組換えベクターを保持する大腸菌形質転換体を、1.5 LのLBにアンピシリンを含有するLB中で培養し、0.01 mに濃縮し、37℃で振とう培養した。1 × 10⁸個/mlに達した時点で、培養液に終濃度10 mMとなるようにEDTAを加え、さらに20分間の時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離（500 g、10分間）により培養菌体を回収し、20 mlの緩衝液（10 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM MgCl₂、0.1% Triton X-100）に懸濁した。菌体懸濁液に終濃度1 mg/mlとなるように、グルコースを加え、37℃で1時間保温することにより菌体を溶解させ、さらに遠心分離（2,000 g、10分間）により菌体残渣を除去した。このようにして得られた清液分を菌体抽出液とした。菌体抽出液におけるスクレオシド・ホスホリラーゼ活性を対照菌pTrec99Aを保持する大腸菌JM105、及びpUC119-PYR2（特開平4-4882）を含有する大腸菌JM109と共に下記表に示す。なお、スクレオシド・ホスホリラーゼ及びヒリミジンスクレオシド・ホスホリラーゼ活性は、山内の方法（特開平4-4882）に従い、70℃におけるそれぞれイソジン及びウレジンの加水分解活性を測定して算出した。

【0.03.7】

【表1】

菌株	70℃におけるスクレオシド分解活性 (units/mg protein)	70℃におけるヒリミジンスクレオシド分解活性 (units/mg protein)**
JM105/pTrec99A	0.9	1.1
JM105/pUC119-PYR2	17.1	11.6
JM105/pTrec-purA	13.4	測定せず
JM105/pTrec-pyn	測定せず	100.3
JM105/pTrec-NB	13.4	68.0

*1 unit = 1 μ mol of Hypoxanthine phosphorylation/min at 70℃

**1 unit = 1 μ mol of Uridine phosphorylation/min at 70℃

【0.03.9】表1に示すように作製した組換えベクターを保持する形質転換体においては、対照菌pTrec99Aを保持する大腸菌JM105の1.0倍以上の高温で活性を有するスクレオシド・ホスホリラーゼ活性が確認された。また、本発明で造成された形質転換体pTrec-NB（保持菌は、従来法（特開平1-1882）で造成された形質転換体pUC119-PYR2保持菌）の6～8倍のスクレオ

シド・ホスホリラーゼを生産できることも確認された。また、この形質転換体の生産性は、対照である好熱菌*Bacillus stearothermophilus* HB-2株の約8倍に相当する。なお、これら組換えベクターを保持する大腸菌形質転換体より調製されたスクレオシド・ホスホリラーゼは、好熱菌由来の酵素と同等の性質を有していた。

【0.03.9】実施例4：培養菌体を用いたスクレオシド

アナログ（リバビリン）の合成

実施例3と同様の方法で得られたpTrec-NEを保持する大腸菌 JM109株の培養液1.0 mlより遠心分離により培養菌体を回収し、1 mlの生理食塩水に懸濁した。この菌体懸濁液に塩基供与体として4.0 mMの1, 2, 4-トリアゾール-3-カルボキサミド（以下、「トリアゾール」と略称する）、また糖残基供与体として6.0 mMのウリジンを含む1.0 mMリン酸緩衝液（pH 6.0-9.0）を添加し、4.5℃で1時間反応させリバビリンを合成した。生成したリバビリンは、文献の方法（国際特許公開WO/90/10080号）に従い、HPLCでリバビリンの生成率を測定した結果、対トリアゾール比9.2%でリバビリンが合成された。また、副産物の生成は認められなかった。

【0040】実施例5 菌体抽出液を用いたヌクレオシドアナログ（リバビリン）の合成

実施例4と同組成のトリアゾール、ウリジンを含むリン酸緩衝液（0.0 M）に、実施例3で調製された形質転換体JM109（pTrec-NE由来の菌体抽出液を18.6 μl添加（終濃度プリンスクレオシド・ホスホリラーゼ10 unit/ml、ピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼとし5 unit/ml）して、5.0℃で8時間反応させた。実施例4と同様の方法でリバビリンの生成率を測定した結果、対トリアゾール比9.0%でリバビリンが合成されていることが確認された。また、先と同様、副産物の生成も認められなかった。

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のプリンスクレオシド・ホスホリラーゼ及

びピリミジン・ヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含む4.8 kb SacI-EcoRI DNA断片の制限酵素地図図を示したものである。

【図2】図2は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のプリンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、S.D.はSD配列を、Metはプリンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドン、stopはその停止コドン、Met of gpynはピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドン、をそれぞれ示す。

【図3】図3は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、S.D.はSD配列を、Metはピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の翻訳開始コドン、stop of gpynAはプリンスクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子の終了位置をそれぞれ示す。

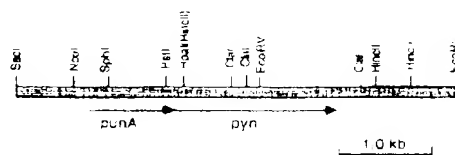
【図4】図4は、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* TH6-1株由来のピリミジンヌクレオシド・ホスホリラーゼ構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を示したものである。図中、stopはその停止コドンを示す。なお、図3及び4に示された塩基配列は一連の連続した塩基配列である。

【図5】図5は、組換えプラスミドベクター pTrec-punAの構築法を示したものである。

【図6】図6は、組換えプラスミドベクター pTrec-pynの構築法を示したものである。

【図7】図7は、組換えプラスミドベクター pTrec-NEの構築法を示したものである。

【図1】



[201]

10 20 30 40 50 60
 ATAGGAAAT AGGCTGTTT ATTAGGAT ATTAGGATATG ATTAGGATATG ATTAGGATATG
 70 80 90 100 110 120
 TGTGTATATG AAGGATGA ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG
 130 140 150 160 170 180
 ATAGGATGA AGGATTTGAC AAAAGTTTGG ATAGGATG ATAGGATG ATAGGATG
 190 200 210 220 230 240
 TTTAAGAGAT TTTAAGATAG GAGGTTTAA ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG
 250 260 270 280 290 300
 TACAATTTT AAAAGAAAAG TTTTCAAGTT ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG
 310 320 330 340 350 360
 ATTAGGCTCT GTTGGGCTAT GAGATTCAT ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG
 370 380 390 400 410 420
 TAAATTTCT TGTATGAGG GTTGAAAGG ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG
 430 440 450 460 470 480
 AAGGAGGAG AGTAGTGGT ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG
 490 500 510 520 530 540
 ATAAGGATG GTTGGCTGT GGGGTGATG ATAGGATATG ATAGGATATG ATAGGATATG
 550 560 570 580 590 600
 TAAATGGGG AGGTGGTCT AATCAATCT TGAAGGGG GTATTAATG ATTATTTAG
 610 620 630 640 650 660
 ATCATATTAA TAACATGGG GGAATGGG TATGGGCT GAAATGATG GCAATGGG
 670 680 690 700 710 720
 TGGGTTGGG AGACATGCG GAAGCATATA GAAAGGAGT TGGTCAAGT GCAAGGATG
 730 740 750 760 770 780
 TAAAGAAAG CATCGGTTA CGTGTGGGG AAGGTGCTA TGTGGGATG ACGGTTGAG
 790 800 810 820 830 840
 GTATGAAAG GCGGGCAGAA ATTTGATGA TTGTGATG GTTGGGATG GTTGGGATG
 850 860 870 880 890 900
 TGTCAAGGG GTTGAAGTG ATGTTGGG GTTGGGATG ATTTGAAGT GTTGGGATG
 910 920 930 940 950 960
 GTTGAATG GAATATGGG GGAATTAAT ATTTGAAGT GTTGGGATG GTTGGGATG
 970 980 990 1000 1010 1020
 TAAAGAT GATGGAAGGAT AAGGATGAT TTTAAGAT TTTAAGAT TTTAAGAT
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT AAGGATGAT

【図3】

10	20	30	40	50	60
CTGCAGGTAT	TTTACATCAG	CCGCTTACCC	ATCATGAAGT	GATCGAAACG	ACGGAAAAAG
PstI					
70	80	90	100	110	120
TAAAAGCTGA	CTTTTACGA	TTTGTGAAGC	CGATCGTACG	CAACATGGCG	AAAAATTAAA
				stop of qppunA	
130	140	150	160	170	180
CGAGAAGGTG	AACGACGATG	AGAATGGTCC	ATTTAATTCA	GAAAAAACCT	GATGGTCATG
S.D.	Met				
190	200	210	220	230	240
CGTTAACGAA	AGAAGAAATT	CAGTTTATTA	TTCAAGGTTA	CACAAAACGC	GATATTCCTG
250	260	270	280	290	300
ATTATCAAAT	GAGCGCATTA	GGGATGGCGA	TTTTTTTCCG	GGGCATGAAT	GAAGAAAGAG
310	320	330	340	350	360
CAGCGGAATT	GACGATGGCG	ATGGTGCATT	CAGGCGATAC	GATCGACCTT	TCGCCAATTG
370	380	390	400	410	420
AAGGAATTAA	AGTAGACAAA	CATTCAACCG	CGGGAGTGGG	CGATACAACA	ACGTTACTGC
430	440	450	460	470	480
TTGGCCCTCT	TGTCGCCTCC	GTCGGTGTTC	CGTTTGGGAA	AATGTCTGGG	CGCGGCCCTG
490	500	510	520	530	540
GACATACGGG	TGGAACGATC	GACAAACTAG	AATCGGTGCC	AGGTTTTCAC	GTTGAAATTA
550	560	570	580	590	600
CGAACGATGA	ATTTATCGAT	CTTGTCAATA	AAAATAAAAT	TGCCGTGTGC	GGTCAGTCTG
610	620	630	640	650	660
GTAATTTGAC	GCCAGCGGAC	AAAAAGTTGT	ATGCGCTTCG	TGATGTGACG	GCAACGCTCA
670	680	690	700	710	720
ATAGCATTEC	GTAAATTGCC	TCATCGATTA	TCAGCAAAAA	AATTGCCGCA	GGGGCAGATG
730	740	750	760	770	780
CGATCCTACT	TGACGTAAAA	ACAGGTCTCG	CCCCGTTTAT	GAAAGATTTA	AACGATGCCA
790	800	810	820	830	840
AAGCATTAGC	GAAAGCGATG	CTCGATATCG	GAAATCGGCT	TGCGCGTAAA	ACGATGGCAA
850	860	870	880	890	900
TTATTTCTGA	TATGAGCCAG	CGGCTTGGTT	ATGCCATTCC	AAATGGGCTT	GAAGTGAAGC
910	920	930	940	950	960
AAGCGATTGA	TACGTTAAAA	GGAGAAGGTC	CACAAGATTT	GCAACAGCTG	TGCTTAATG
970	980	990	1000	1010	1020
TTGGTAGCCA	CATGGTATAT	TTAGCGGAAA	AACGATCTTC	GCTTGAAGAA	GCTCGTATTA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TGTTAGAAAA	AGCGATGAAA	GACGGTTGAG	TCCTGAAAC	ATTATAAAGC	TTCTTAGCTG

(その1)

(24)

```

1090      1100      1110      1120      1130      1140
GGAAGGCTGG GATTCATCT GTTGTGGATG AGTCAAGGAA ATTGGGAAA GAAATATAAG

1150      1160      1170      1180      1190      1200
TTATTGAACT ACAAAGGAAA GAAGATGGAT AGTATGCGA AATTGTGGG GATGAGGAG

1210      1220      1230      1240      1250      1260
GAAGGAGGGG CATGTGGCTT GGTGGAGGG GAGGAGCGAA AGAATCAAGG ATCGATTGA

1270      1280      1290      1300      1310      1320
CTTGTGGCTT GGTGGTTCGG AAAAAAGTGG GGTATGGGT GAAAAAGGT CAATGATTA

1330      1340      1350      1360      1370      1380
TTACAATTTA CAGCAACCGT GAAGAACTGG ATGATGTAAA AAAAAAGTA TATGAAAAAG

1390      1400      1410      1420      1430      1440
TTGCTATTTC ACAAACAGCT GTTCAAGCTG CAACAATTAAT TTAGGATAAA ATTGTGTAAG

1450      1460      1470      1480      1490      1500
GTGAAGGATT CATTCCTTCA GGTTTTTTTA TGTATAAAAA AATAAAAAAT GGAAAGGATG

1510      1520      1530      1540      1550      1560
GCAAGTATAA AGAAATGGAG GGTGGAGAT GAAGCGATT TTGTCATCT TTGCTATTTC

1570      1580      1590      1600      1610      1620
GTTTCTTTTT GTTCCAAAGG TCGTTGTGGG GGGCGAAGAG TCGAAAAATTG AATTAAAGAT

1630      1640      1650      1660      1670      1680
TGAGGCGCGA TCAGCAATTT TAATTGAGAG AGACACAGCG GCTGTTTTCT ATGAAAAAAA

1690      1700      1710      1720      1730      1740
TGCCCATGAG CCGCTTCCAC CAGCGAGCAT GACGAAATTT ATGACAATGC TTCTATTAT

1750      1760      1770      1780      1790      1800
GGAAGCGATT GATCAAGGAA AGTTGAAGAT AGAGGAGCGA GTGGGGGCAA GTGAATAAGG

1810
TCCATCGAT
GlaI

```

(その2)

【図5】

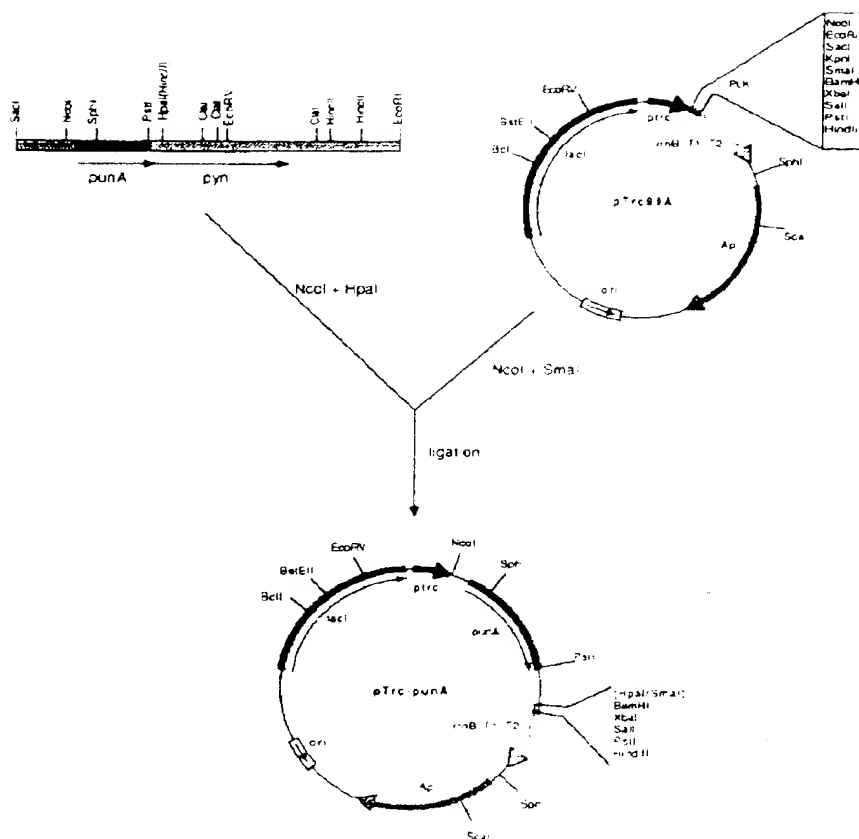
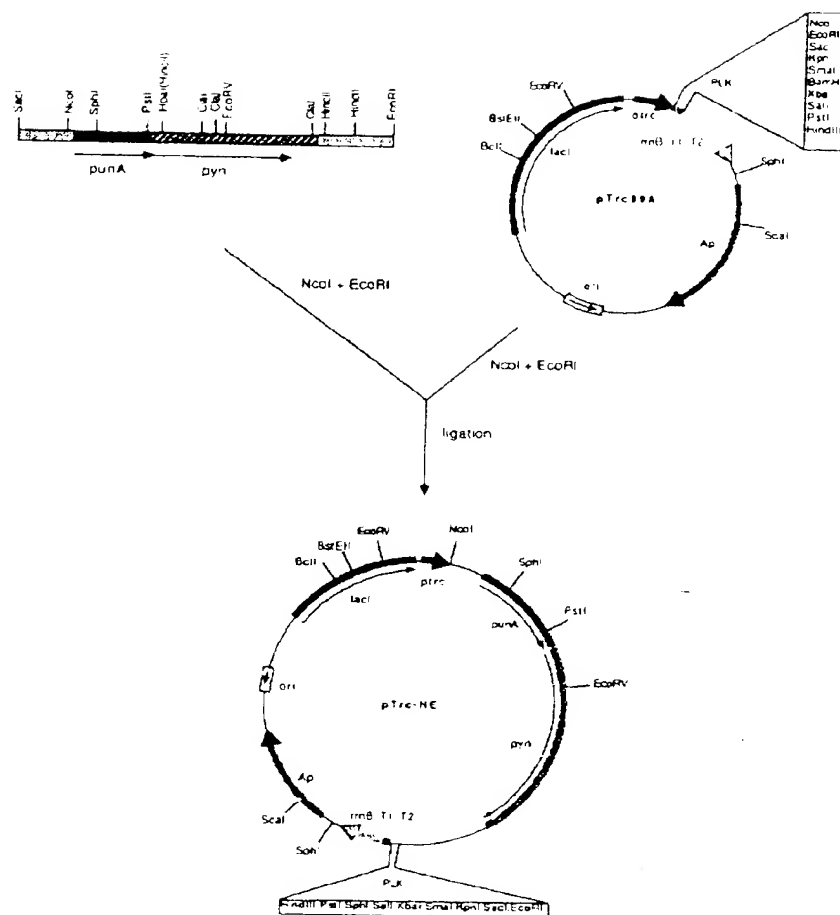


Diagram illustrating the construction of a pTrc-uvrA reporter construct. The process starts with a linear DNA fragment containing a puvA gene and a puvH gene. This fragment is partially digested with HindIII and ligated with a pTrc-uvrA plasmid. The resulting circular plasmid is then digested with PstI to resolve the puvA fragment. The final construct is a circular plasmid containing the pTrc promoter, the puvA gene, and the puvH gene.

【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 N 1:21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9:10

C 1 2 R 1:19)

